

## ARTÍCULO ORIGINAL - Original Article

### SOBRE-EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA p16 EN BIOPSIAS CON DIAGNÓSTICO DE NIC I, POSITIVAS PARA GENOMA DE PAPILOMA VIRUS HUMANO. INSTITUTO DEL CÁNCER. SOLCA CUENCA-ECUADOR. 2009-2010.

Murillo Bacilio Magdali del Rocío (1), Ugalde Puyol Jorge Edmundo (2), Palta González Araceli Miroslava (1), Picón Coronel María Gabriela (3)

(1) Md. Anatomo-Patólogo del Instituto del Cáncer SOLCA Cuenca. Docente de la Universidad de Cuenca. (2) Doctor en Medicina y Cirugía. Jefe del Departamento de Patología del Instituto del Cáncer SOLCA Cuenca. (3) Md. Anatomo-Patólogo del Instituto del Cáncer SOLCA Cuenca.

Correspondencia: rocimurillo4@yahoo.com.mx

Fecha de Recepción: 31/08/2015

Fecha de Aprobación: 03/12/2015

#### RESUMEN

Numerosos estudios mencionan que la sobre-expresión de la proteína p16, un marcador biológico que permite identificar lesiones pre-neoplásicas del epitelio exocervical, tendría una alta asociación con el Papiloma Virus Humano (HPV) de alto riesgo oncogénico. Es un estudio descriptivo correlacional cuyo objetivo fue establecer asociación de las Neoplasias Intraepiteliales Cervicales grado I (NIC I), HPV positivos, con la expresión del p16.

**Materiales, métodos y resultados:** Es un estudio correlacional que se realizó en el período de noviembre de 2009 a noviembre de 2010; se presentaron 256 casos de NIC I de los cuales, 72 fueron HPV positivos; se practicó técnica de p16. La edad promedio de las mujeres fue de 41 años. Se encontró positividad para el p16 en 40 casos (55.6%) y fueron negativos 32 (44.4%). De los casos positivos para p16, los tipos virales más frecuentes fueron los de alto riesgo: 33 (82.5%). El p16 fue valorado en cuantía, distribución e intensidad, estableciéndose relación entre la intensidad del p16 con los virus de alto riesgo ( $p=0.038$ ). Cuando se analizó la edad y el tipo viral, pacientes entre 20 y 40 años (36 casos, 90%) presentaron genoma de HPV de alto riesgo.

**Conclusiones:** Existió correlación entre la intensidad del p16 con la presencia de HPV de alto riesgo, ayudando a seleccionar grupos con tendencia a la progresión de la enfermedad.

**Palabras clave:** HPV16, Human papillomavirus 16, Neoplasia Intraepitelial Cervical, Indicadores de Morbimortalidad,

#### ABSTRACT

Numerous studies report that overexpression of p16 protein that is a biomarker to identify premalignant exocervical epithelium lesions would have a high association with human papillomavirus (HPV) with high oncogenic risk. It is a descriptive correlational study whose objective was to establish association of Cervical Intraepithelial Neoplasia grade I (CIN I), HPV positive, with the p16 expression.

**Materials, methods and results:** It is a correlational study conducted from November 2009 to November 2010; about 256 cases of CIN I were presented, 72 were positive HPV; also p16 technique was performed. The women average age was 41 years. There were 40 (55.6%) positive cases for p16, and only 32 (44.4%) were negative. From the positive cases for p16, the most common viral types were high-risk patients: 33 (82.5%). The p16 was valued in amount, distribution and intensity, establishing a relationship between the intensity of p16 with high-risk virus ( $p = 0.038$ ). When the age and viral type were analyzed, patients between 20 and 40 years (36 cases, 90%) presented HPV genome with high risk.

**Conclusions:** There is correlation between the intensity of p16 with the presence of HPV high risk, helping select groups prone to disease progression.

**Keywords:** HPV. Human papillomavirus 16, Cervical Intraepithelial Neoplasia, Indicators of Morbidity and Mortality.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer cervical es el segundo más común en las mujeres en todo el mundo y sigue siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad. Constituye un problema de salud pública por su frecuencia e incidencia; provoca un número elevado de muertes en América Latina y el Caribe, sólo superado por los países de África Oriental. Se trata de una entidad que a pesar de ser prevenible, sigue siendo una de las causas frecuentes de mortalidad por cáncer en el mundo, en la región y especialmente en nuestro país (1).

La tasa cruda y estandarizada de incidencia en el cantón Cuenca para el periodo 2005-2009 es de 16.0 y 16.9; respectivamente. Estas cifras ubican al cáncer de cérvix en el segundo lugar de incidencia, después del cáncer de piel (2).

Por este motivo, la identificación de las lesiones neoplásicas intraepiteliales cervicales (NIC), que constituyen los cambios displásicos de las células epiteliales, es imperativo. Se han mencionado prevalencias de 50.2, 34.0 y 36.4 por 100,000 habitantes para NIC I, NIC II, NIC III respectivamente. El diagnóstico se determina en la observación de características histológicas ya establecidas. El examen histológico es el estándar de oro, para identificar el tratamiento de estas lesiones, sin embargo, en el análisis morfológico puede ser difícil distinguir entre metaplasia e hiperplasia con NIC I y a su vez entre lesiones intraepiteliales de bajo y alto grado. El diagnóstico de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) en las tinciones de hematoxilina-eosina, es complejo y está sujeto a variaciones inter e intraobservador, cuando la lesión displásica es muy escasa en la muestra, artefactos en la sección tangencial están presentes o cuando se acompañan de lesiones reactivas o inflamatorias. Otra fuente de error constituyen las lesiones de displasia con morfología no usual. Por lo tanto, métodos diagnósticos más objetivos que la histología, son necesarios para diagnosticar con precisión las neoplasias intraepiteliales, en muestras histológicas (3-6).

En la actualidad existe un consenso, en considerar a los virus del papiloma humano del

tipo genital (HPV) como los principales agentes etiopatogénicos del cáncer de cérvix y lesiones precursoras, atribuyéndosele un rol de tipo causal en la carcinogénesis. La infección provocada por el HPV es una de las enfermedades de transmisión sexual más común que aqueja el 50-80% de la población. Los aproximadamente 35 genotipos del HPV que afectan al tracto genital femenino se han clasificado en virus de alto y bajo riesgo oncógeno en función de su capacidad de transformación maligna del epitelio del cérvix. El HPV de bajo riesgo se presenta con una frecuencia del 90%, los de alto riesgo son principalmente los tipo 16 y 18 pero también otros como el 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 y otros menos frecuentes; presentes en la mayoría de los carcinomas de cérvix y en todas las lesiones precursoras con una frecuencia del 70% (7). El mejor método en la actualidad para su diagnóstico es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el mismo que puede detectar HPV de alto riesgo hasta un 95% (8,9).

En la patogénesis de la transformación neoplásica, mediada por el HPV está implicada de forma determinante la inactivación del p53 y del retinoblastoma (pRb) por los productos de los genes virales E6 y E7. Se ha demostrado la existencia de una correlación recíproca entre pRb y p16, esta última considerada como una proteína reguladora del ciclo celular, por lo que existe una fuerte sobre-expresión de p16 tanto en los carcinomas como en las lesiones preneoplásicas del cérvix uterino. La detección de la sobreexpresión de la proteína p16 mediante técnica de inmuno-histoquímica tiene un valor seguro en la identificación de lesiones epiteliales de alto grado, utilizándose también al mismo tiempo para detectar lesiones de bajo grado citológico o histológicamente con integración viral, permitiendo identificar lesiones que pueden evolucionar a lesiones de alto grado (9-11). En el cáncer de cérvix, pRb está funcionalmente inactiva desde el inicio de la carcinogénesis cervical como consecuencia de la expresión del gen E7 del HPV (10). La presente investigación introduce un nuevo factor pronóstico en la identificación de lesiones tempranas con capacidad de progresión.

La sobre-expresión del p16 es fácil de detectar mediante inmuno-histoquímica, para demostrar la presencia de antígenos en células y tejidos. Esta sobre-expresión ha sido propuesta como un marcador biológico, que permitiría identificar de forma inequívoca las células con cambios displásicos inducidos por el HPV sobre todo los tipos de alto riesgo, mejorando así la especificidad diagnóstica y solucionando los problemas anteriormente expuestos de variabilidad inter e intraobservador. Por lo tanto, la determinación del p16 nos informa de la interacción del HPV con las proteínas reguladoras del ciclo celular y constituye un marcador de proliferación neoplásica (10,11).

La valoración del p16 es considerada como tinción positiva cuando la expresión es localizada a nivel nuclear o citoplasmática en una proporción del 5-10% de las células atípicas. El patrón puede ser irregular y disperso. Existen datos que refieren una expresión hasta del 81% del p16 en NIC I (12).

El objetivo de nuestro estudio fue correlacionar los hallazgos histológicos del NIC I, con la expresión del p16 y el subtipo de HPV por PCR.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se realizó un estudio de tipo descriptivo durante el período noviembre de 2009 a noviembre de 2010, en el Departamento de Anatomía Patológica del Instituto del Cáncer SOLCA – Cuenca. Se diagnosticaron 256 casos de NIC I de los cuales, 72 cumplieron con los criterios de inclusión, es decir que contaban con material histológico y estudio de HPV mediante PCR.

En todos estos casos se realizó p16 mediante técnica de inmuno-histoquímica. Para esto se realizaron dos cortes de cada bloque de parafina con el tejido de biopsia de cérvix, uno fue teñido con hematoxilina eosina y el otro se destinó para análisis de inmuno-histoquímica con el anticuerpo monoclonal específico p16INK4a (BIOSB) con la clona 16PO4, JC2 dilución 1:25 con un tiempo de incubación de dos horas y recuperación. La valoración del p16 es nuclear y/o citoplasmático. Puede ser positivo o negativo. Cuando es positivo se analizan tres variables: intensidad (débil +, moderado ++, fuerte +++), cuantía (negativo: ausencia de tinción; positivo aislado: tinción en menos del 5% de las células displásicas; positivo focal: tinción entre 6 y 30% de células displásicas; positivo difuso: tinción en más del 30%) y distribución (basal: capa basal; variable: distintas áreas del epitelio; completo: todo el epitelio).

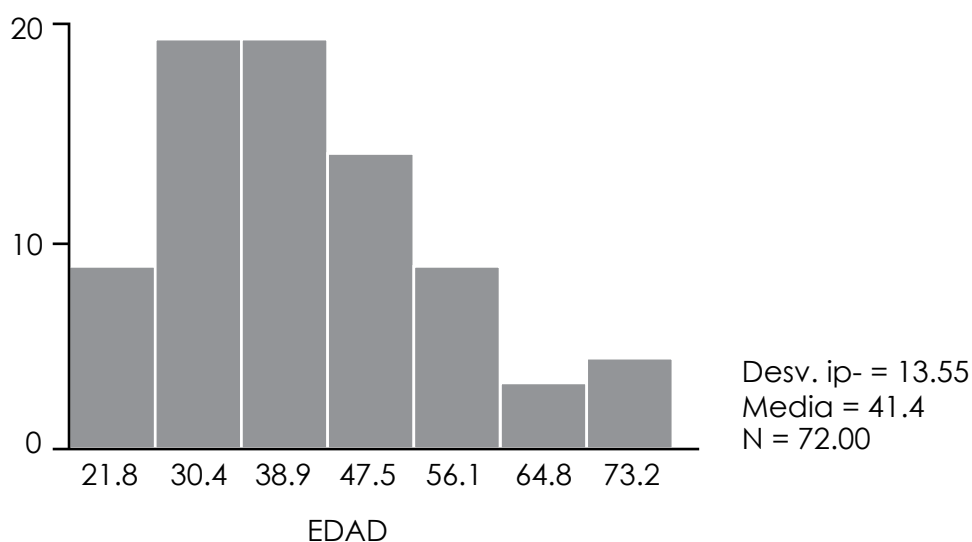
La valoración de HPV mediante PCR se hizo mediante la siguiente técnica: se realiza la extracción del ADN. Posteriormente se realizan dos PCR en el termociclador de marca Techne. La primera busca la región MY-L1C y la siguiente sirve para buscar virus de alto y bajo riesgo que incluye una nested (PCR interna), finalmente se hace una siembra en gel de agarosa y se valora en rayos UV.

### **Análisis estadístico**

Para el plan de análisis se dispuso del programa estadístico SPSS v15. Empleamos frecuencias, media, mediana y desvío estándar. Para las asociaciones se utilizó el  $\chi^2$ .

## RESULTADOS

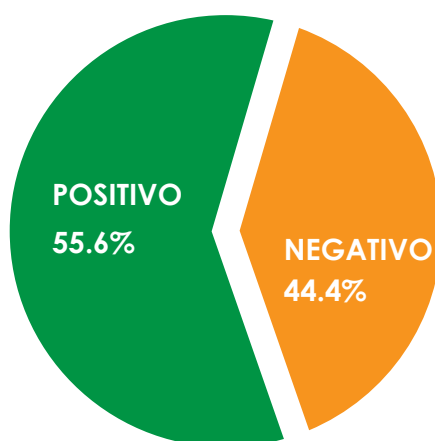
**Gráfico 1: Distribución de los pacientes según edad**



Fuente: Instituto del Cáncer SOLCA - Cuenca

La edad máxima fue de 77 años y la mínima de 20. La edad promedio fue de 41. La desviación estándar fue de 13.5.

**Gráfico 2: Distribución de los 72 pacientes según presencia de p16**



Fuente: Instituto del Cáncer SOLCA - Cuenca

Se observó positividad para el p16 en 40 casos (55.6%) y negativos 32 (44.4%).

**Tabla 1: Distribución de los 72 pacientes según valoración nuclear de p16 y HPV**

| Variable            | Subtipo HPV por riesgo |      |            |      |       | Valor P |
|---------------------|------------------------|------|------------|------|-------|---------|
|                     | Nivel                  | Alto | Intermedio | Bajo | Total |         |
| <b>Intensidad</b>   | +                      | 13   | 0          | 0    | 13    | 0.038*  |
|                     | ++                     | 11   | 5          | 1    | 17    |         |
|                     | +++                    | 9    | 0          | 1    | 10    |         |
| <b>Total</b>        |                        | 33   | 5          | 1    | 40    |         |
| <b>Cuántía</b>      | Aislado                | 11   | 3          | 0    | 14    | 0.053*  |
|                     | Difuso                 | 3    | 0          | 1    | 4     |         |
|                     | Focal                  | 19   | 2          | 1    | 22    |         |
| <b>Total</b>        |                        | 33   | 5          | 2    | 40    |         |
| <b>Distribución</b> | Basal                  | 8    | 0          | 0    | 8     | 0.547*  |
|                     | Completo               | 3    | 0          | 0    | 3     |         |
|                     | Variable               | 22   | 5          | 2    | 29    |         |
| <b>Total</b>        |                        | 33   | 5          | 2    | 40    |         |

Fuente: Instituto del Cáncer SOLCA - Cuenca

El p16 fue valorado en cuantía, distribución e intensidad. De los casos positivos para p16, los tipo virales más frecuentes correspondieron a los de alto riesgo, 33 casos (82.5%). Existió asociación entre la intensidad del p16 con los virus de alto riesgo ( $p=0.038$ ).

**Tabla 2: Distribución de los pacientes según edad y HPV**

| Edad (años) | Subtipo HPV por riesgo |                  |                 | Total             |
|-------------|------------------------|------------------|-----------------|-------------------|
|             | Alto                   | Intermedio       | Bajo            |                   |
| 20 a 30     | <b>13 (23.2%)</b>      | <b>1 (8.3%)</b>  | <b>2 (50%)</b>  | <b>16 (22.2%)</b> |
| 31 a 40     | <b>23 (41.1%)</b>      | <b>1 (8.3%)</b>  | <b>0 (0%)</b>   | <b>24 (33.3%)</b> |
| 41 a 50     | <b>8 (14.3%)</b>       | <b>8 (66.7%)</b> | <b>0 (0%)</b>   | <b>16 (22.2%)</b> |
| 51 a 60     | <b>6 (10.7%)</b>       | <b>2 (16.7%)</b> | <b>1 (25%)</b>  | <b>9 (12.5%)</b>  |
| 61 a 70     | <b>4 (7.1%)</b>        | <b>0 (0%)</b>    | <b>0 (0%)</b>   | <b>4 (5.6%)</b>   |
| 71 a 80     | <b>2 (3.6%)</b>        | <b>0 (0%)</b>    | <b>1 (25%)</b>  | <b>3 (4.2%)</b>   |
| Total       | <b>56 (100%)</b>       | <b>12 (100%)</b> | <b>4 (100%)</b> | <b>72 (100%)</b>  |

Fuente: Instituto del Cáncer SOLCA - Cuenca

Se hizo una relación entre la edad y el tipo viral, demostrándose que la edad entre 20 y 40 años (36 casos; 64.3%) presenta genoma de HPV de alto riesgo.

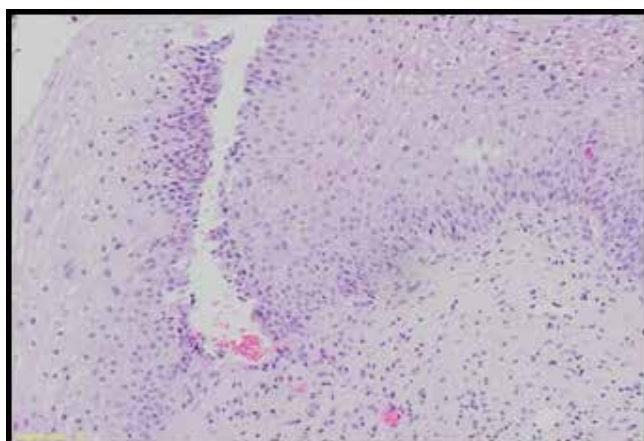


Fig. 1. HE 20x. Corte de cérvix con NIC I, existe hiperplasia de la basal y células con cambios displásicos

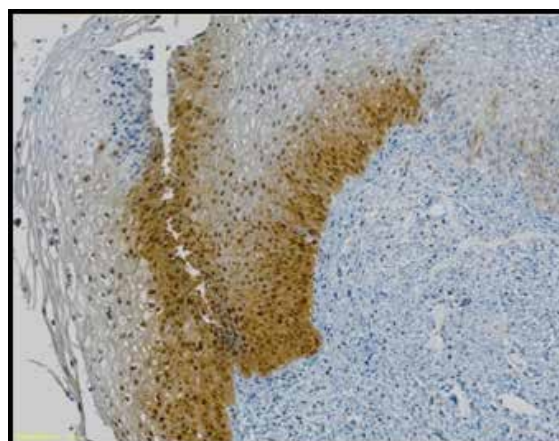


Fig. 2: Inmunohistoquímica p16 positiva con intensidad fuerte, cuantía difusa, y distribución variable



## DISCUSIÓN

El carcinoma cérvico-uterino es una de las neoplasias más frecuentes en la población mundial, por lo cual se han establecido métodos de detección precoz; la búsqueda citológica mediante el examen cérvico-vaginal (Papanicolaou) ha sido una técnica eficiente para detectar en forma temprana neoplasias y reducir así su morbilidad y mortalidad. Sin embargo, este método tiene desventajas como el error inter o intraobservador al momento de la evaluación citológica, dando como resultado altos índices de falsos positivos y falsos negativos (13,14), por lo que el estudio de la biopsia cervical ha sido considerado como complemento para el diagnóstico de neoplasia cervical. El análisis histopatológico sin embargo, ha presentado una gran variabilidad diagnóstica intra e interobservador (15).

La prevalencia global de estas lesiones preinvasoras es del 10 a 15%. Las edades de máxima prevalencia son entre los 15 y 30 años para la NIC I, 30 a 34 años para NIC II, y 35 a 49 para NIC III (16).

En este estudio, la edad de afección se observó entre los 20 y los 40 años, lo cual es cercano con la literatura existente como el estudio realizado por Quintero y col (14) en donde se menciona que el mayor número de lesiones intraepiteliales surge entre los 26 y 30 años.

La determinación del tipo de HPV, permite distinguir mujeres que poseen riesgo elevado de desarrollar carcinoma cérvico-uterino o lesiones precursoras intraepiteliales escamosas. El predominio oncogénico del HPV de alto riesgo depende de la interacción del producto viral con proteínas específicas del huésped. En este estudio, la expresión inmunológica del p16 es observada únicamente en células neoplásicas y no en células normales, lo cual parece ser un marcador sensible y específico, como lo menciona Lesnicova y colaboradores (15).

Otro punto que debe ser tomado en cuenta, es que estos casos positivos para p16 ( $n=40$ , 55.6%), los tipos virales más frecuentes correspondieron a los de alto riesgo, lo cual coincide con los estudios realizados por Klaes y col. y Fuji Nam y col., cuyos resultados indican positividad en el 100% de los NIC I y aquellos en donde la expresión fue intensa estuvieron asociados con virus de alto grado, por lo que se concluye que el p16 podría estar involucrado en la carcinogénesis inducida por HPV. Lo anterior demuestra que la inmuno-tinción de p16 por inmuno-histoquímica, es una técnica útil para identificar lesiones preneoplásicas del epitelio exocervical, y distinguirlos de condiciones reactivas. Este marcador es valioso tanto en biopsias de tejidos (histopatológico) como en citologías. En los cortes histológicos que representan el método estándar de detección de lesiones cervicales, su uso debe ser protocolizado.

## CONCLUSIÓN

En esta investigación, la expresión del p16 se observó en mayor porcentaje en los casos de NIC I positivos para HPV; existió una alta asociación entre la intensidad y la cuantía del p16, en relación con presencia de HPV de alto riesgo. Estos resultados contribuyen a la selección de grupos con probabilidad de progresión de la enfermedad, para seguimiento de las pacientes.

## AGRADECIMIENTO

Expresamos nuestro agradecimiento a las autoridades del Instituto del Cáncer SOLCA-Cuenca.

## CONFLICTOS DE INTERÉS

No existen conflictos de interés.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Tavassoli F. Tumours of the breast and female genital organs, Lyon 2003.
2. Sexto Informe de la Incidencia del Cancer en el cantón Cuenca. Registro de tumores Solca-Cuenca, Anuario 2005-2009.
3. Ordi Jaume. p16 y cérvix uterino. Valor en la detección de lesiones ocultas y en la mejora de la concordancia inter-observador. XVIII Congreso de la AEPCC-Granada, 22-24 noviembre 2006.
4. Jingbo W, Xiao-Jing L, Wei Z, Xiu-Ping L. Detection and pathological value of papillomavirus DNA and p16INK4A and p53 protein expression in cervical intraepithelial neoplasia. *Oncology Letters* [serial on the Internet]. (2014, Mar), [cited July 29, 2015]; 7(3): 738-744. Available from: Academic Search Complete.
5. Zhao Y, Chang I, Fang-hui Z, Shang-ying H, Smith J, You-lin Q, et al. Distribution of cervical intraepithelial neoplasia on the cervix in Chinese women: pooled analysis of 19 population based screening studies. *BMC Cancer* [serial on the Internet]. (2015, June), [cited July 30, 2015]; 15(1): 1-8. Available from: Academic Search Complete.
6. Volgareva G, Zavalishina L, Andreeva Y, Frank G, Krutikova E, Kissel'ov F, et al. Protein p16 as a marker of dysplastic and neoplastic alterations in cervical epithelial cells. *BMC Cancer* [serial on the Internet]. (2004, Jan), [cited October 26, 2015]; 458-10. Available from: Academic Search
7. Colmenares B, Daicy M, Silva G. Diagnóstico de Lesiones Intraepiteliales de Cuello Uterino. Comparación entre Citodiagnóstico, Biopsia y Reacción en Cadena de la Polimerasa. (Spanish). *Informe Medico* [serial on the Internet]. (2011, Sep), [cited July 29, 2015]; 13(9): 431-439. Available from: Academic Search Complete.
8. Eun Ji Nam. Expression of the p16INK4a and Ki-67 in relation to the grade of cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human papillomavirus infection. *J Gynecol Oncol* Vol.19, No. 3:162-168, September 2008.
9. Vince A, Lepej S. Diagnostic methods and techniques in cervical cancer prevention Part II: Molecular diagnostics of HPV infection. *Medicinski Glasnik* [serial on the Internet]. (2010, Feb), [cited July 30, 2015]; 7(1): 18-25. Available from: Academic Search Complete.
10. Izzeddin Rula, Ladera María, Hurtado María, Utilidad de la detección inmunocitoquímica de p16, en el diagnóstico diferencial de lesiones reactivas y neoplásicas en muestras de citología cervical, *Salus, Facultad de Ciencias de Salud, Volumen 12 No3, diciembre 2008, Pag 45.*
11. Zertuche-Zuani J, Salazar-Gallegos M, Peña-Jiménez Á, Vera-Gaspar D. Marcadores inmunohistoquímicos para virus de papiloma humano. Revisión sistemática. (Spanish). *Revista De Sanidad Militar* [serial on the Internet]. (2013, Sep), [cited July 29, 2015]; 67(5): 205-213. Available from: Academic Search Complete.
12. Pacchiarotti A, Galeotti S, Bellardini P, Chini F, Collina G, Rossi P, et al. Impact of p16INK4a Immunohistochemistry Staining on Interobserver Agreement on the Diagnosis of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *American Journal Of Clinical Pathology* [serial on the Internet]. (2014, Mar), [cited July 29, 2015]; 141(3): 367-373. Available from: Academic Search Complete.
13. Izadi-Mood N, Asadi K, Shojaei H, Sarmadi S, Ahmadi S, Chelavi L, et al. Potential diagnostic value of P16 expression in premalignant and malignant cervical lesions. *Journal Of Research In Medical Sciences* [serial on the Internet]. (2012, May), [cited July 30, 2015]; 17(5): 428-433. Available from: Academic Search Complete.
14. Queiroz C, Silva TC, Alves VA, Villa LL, Costa MC, Travassos AG, Filho JB, Studart E, Cheto T, de Freitas LA. p16INK4a expression as a potential prognostic marker in cervical pre-neoplastic and neoplastic lesions. *Pathol Res Pract* 2006; 202: 77-83.
15. Lesnikova L, Lidang Marianne, Hamilton-Dutoit Stephen. p16 as a diagnostic marker of cervical neoplasia: a tissue microarray study of 796 archival specimens. *Diagnostic Pathologic* (2009) 4:22
16. Serman Felipe. Cancercervicouterino: epidemiología, historia natural y rol del virus papiloma humano: perspectivas en prevención y tratamiento. *Rev. Chobstet. ginecol.* [internet]. 2002 [citado 2015 nov 09]; 67( 4 ): 318-323. disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=s0717-75262002000400011&lng=es](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0717-75262002000400011&lng=es). <http://dx.doi.org/10.4067/s071775262002000400011>.